

## 29. 脂質代謝改善の分子栄養学的研究

井上 裕康

Key words : PPAR, レスベラトロール, 脂質代謝,  
cAMP, ホスホジエステラーゼ

奈良女子大学 研究院 生活環境科学系  
食物栄養学領域

### 緒言

食生活を通して健康の維持や生活習慣病予防に努めることは、医療費軽減の観点からも重要である。種々の食品機能成分の摂取による脂質代謝改善効果について、これまでに多くの先行研究があるが、厳密な科学的検証を行うことは難しい。その理由の1つは、食品機能成分は薬剤に比べて標的たんぱく質に対する作用が弱いことに起因している。このことが、副作用が少ないという長所とともに、効果が現れるためには長い時間を必要とし、科学的検証を困難にしていると考えられる。しかし、その分子作用機構を解明することは重要である。

リガンド依存性転写因子 PPAR (Peroxisome proliferator-activated receptor) は、生活習慣病に対する薬剤標的として認められている核内受容体である。PPAR のサブタイプ  $\alpha$  と  $\gamma$  に対する合成リガンドは、それぞれ脂質代謝異常改善薬フェノフィブラート、インスリン抵抗性改善薬チアゾリジンとして利用されている。我々は培養細胞と遺伝子改変マウスを用い、PPAR 活性化を指標とした食品機能成分の評価を行っている。これまでに、食用植物由来のレスベラトロールや精油成分が、薬剤に比べると活性化能は低いものの、PPAR 活性化能を有することを報告してきた<sup>1,5)</sup>。

レスベラトロールは、ブドウや生薬・虎杖根に含まれるポリフェノールで、抗酸化活性を持つフィトアレキシンである。長期的な中程度の赤ワイン摂取が心血管疾患の発生率と負の相関性を示す、いわゆる「フレンチパラドックス」に関与する成分として注目を集めている。我々は、レスベラトロールが PPAR  $\alpha$ ,  $\beta/\delta$ ,  $\gamma$  を選択的に活性化し、 $\alpha$  活性化に依存した脳保護効果をもつことを報告した<sup>1,2)</sup>。さらに、レスベラトロールを4週間摂取したマウスの肝臓において、PPAR  $\alpha$  応答遺伝子群および NAD<sup>+</sup> 依存性脱アセチル化酵素 SIRT1 が PPAR  $\alpha$  依存的に誘導されること、40週間以上の長期投与で脂質代謝改善効果を持つことを見出ししている。一方、レスベラトロールの作用点として、SIRT1 の活性化が注目されているが、直接的な作用については議論がなされている。また最近では、レスベラトロールの新しい標的として cAMP 分解酵素ホスホジエステラーゼ (PDE) が報告された<sup>6)</sup>。そこで本研究では、脂質代謝のマスターレギュレーターである PPAR  $\alpha$  のレスベラトロールによる活性化の分子作用機構を明らかにするとともに、PDE 阻害活性との関係について検討した。

### 方法、結果および考察

#### 1. レスベラトロールによる PPAR $\alpha$ 活性化の分子機構

培養細胞を用いてレスベラトロールおよびその構造類似体による PPAR 活性化を比較検討した。ウシ血管内皮細胞 (BAEC) に、PPAR 応答エレメント (PPRE) を有するレポーターベクターとヒト PPAR  $\alpha$  発現ベクターを共導入し、試料添加 24 時間後にルシフェラーゼ活性を測定し、*in vitro* における PPAR  $\alpha$  活性化能を評価した。レスベラトロール同様にスチルベン骨格と 4'位の水酸基を有するが 3, 5 位の水酸基を有さない Trans-4-hydroxy stilbene (T4HS)、3, 5 位がメトキシ基である Ptelostilbene においても PPAR  $\alpha$  活性が認められた。また、4'位にのみ水酸基を有しスチルベン骨格をもたない 4-Phenolazophenol (4-PAP) においても、PPAR  $\alpha$  活性が認められた (図 1)。

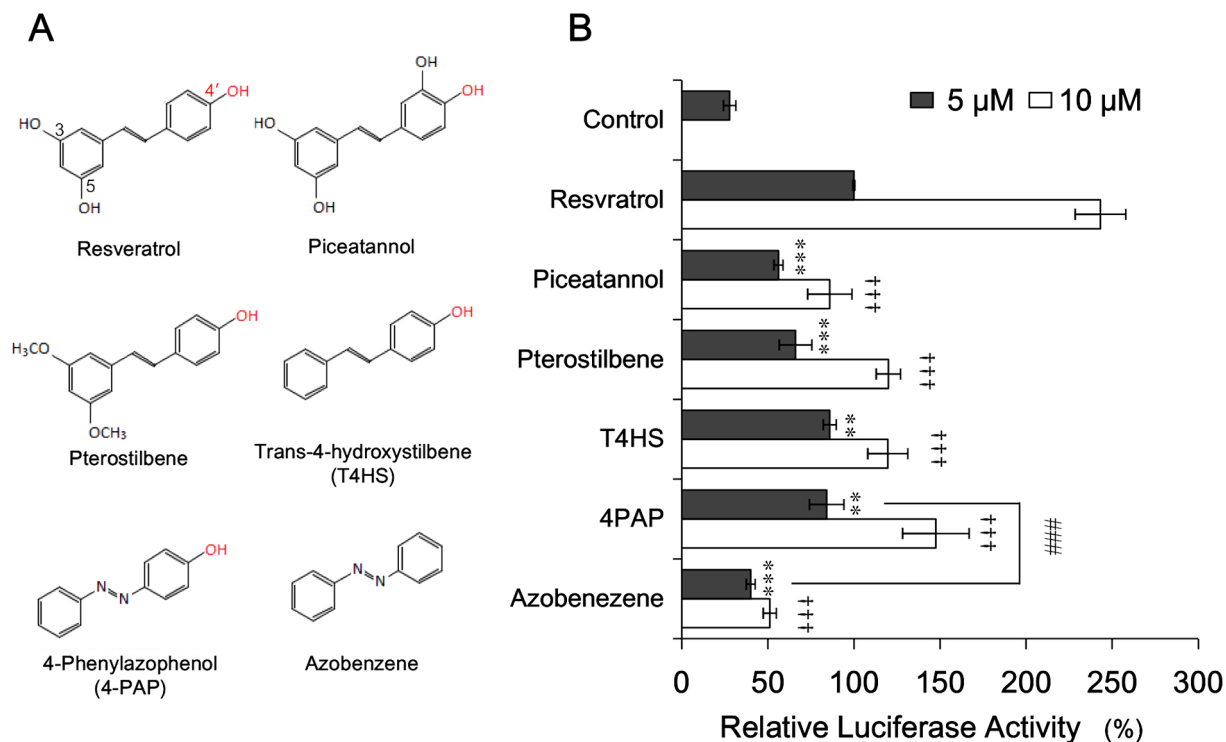


図1. レスベラトロールとその構造類似体による PPAR $\alpha$  活性化検討 (*in vitro*).

A) レスベラトロールと 4'位水酸基を有するレスベラトロール類似体の化学構造. 4'位水酸基を赤色で示した.

B) A) で示した化合物を用いて PPAR $\alpha$  活性化を検討した. ウシ血管内皮細胞 (BAEC) に PPRE を有するレポーターベクター (PPRE-luc) とヒト PPAR $\alpha$  発現ベクター (GS-hPPAR $\alpha$ ) を共導入し, 各化合物 (5  $\mu$ M または 10  $\mu$ M) 添加 24 時間後のルシフェラーゼ活性を測定した. なお,  $\beta$ -ガラクトシダーゼ発現ベクター (pSV- $\beta$  gal) を同時に導入して, その酵素活性で遺伝子導入効率を補正した. 各化合物の PPAR $\alpha$  活性化は, コントロールを 1 とした相対値で示した. Error bar: SD, \*: 5  $\mu$ M レスベラトロールに対する有意差 (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ), \*\*: 10  $\mu$ M レスベラトロールに対する有意差 (\*\*\* $p < 0.001$ ), #: 5  $\mu$ M 4-PAP に対する有意差 (### $p < 0.001$ ), 統計処理: *t*-test.

さらに, 合成リガンドが結合した PPAR $\alpha$  リガンド結合ドメインの X 線構造解析データに基づいてレスベラトロールの結合様式を予測するとともに, その予測に基づいた変異型 PPAR $\alpha$  発現ベクターを用いて, PPAR $\alpha$  活性化能を測定した. これらの解析から, レスベラトロールの 4'位水酸基が PPAR $\alpha$  活性化に直接関与する可能性が高いことを見出した.

この水酸基の関与をさらに明らかにするため, 4-PAP (0.04%) を普通食とともに PPAR $\alpha$  欠損型または対照野生型雄性マウス (129/SV) に摂取させた. 8 週間後に肝臓を採取し, RNA を抽出して定量 RT-PCR 法により遺伝子発現を解析した. 野生型マウスの肝臓では, 4-PAP の摂取によってアシル CoA オキシダーゼ 1, カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ 1A, アディポネクチン受容体 2 などの PPAR $\alpha$  応答遺伝子の有意な発現上昇が見られた. 一方, PPAR $\alpha$  欠損型マウスではいずれの遺伝子においても発現誘導は見られなかったことから, 野生型マウスでのこれらの発現誘導は PPAR $\alpha$  依存的であった. また, PPAR $\alpha$  応答遺伝子配列を持たない SIRT1 においても, PPAR $\alpha$  依存的に遺伝子発現が有意に上昇した (図 2).

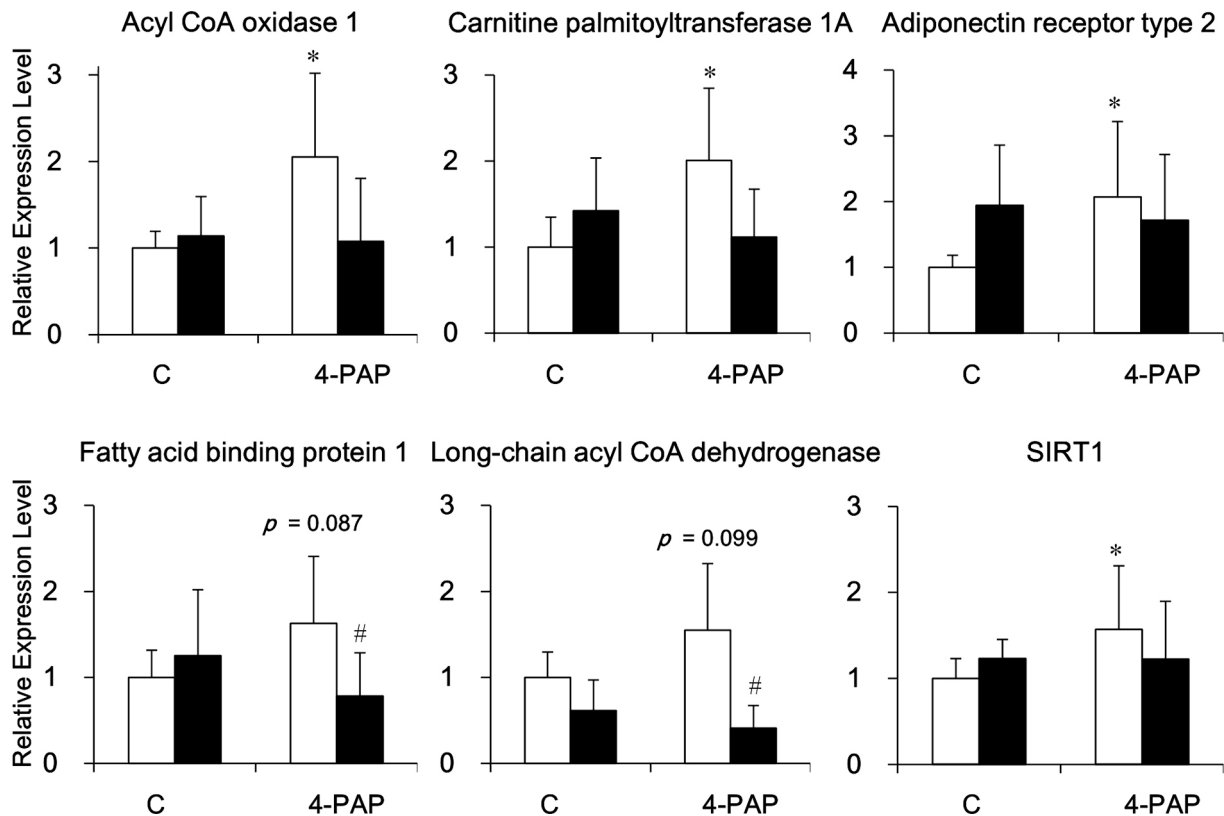


図2. 4-PAPによるPPAR $\alpha$  応答遺伝子とSirt1の発現誘導 (*in vivo*).

PPAR $\alpha$  欠損型 (KO □) または対照野生型 (WT ■) 雄性マウス (129/SV) に4-PAP (0.04%) を普通食 (C) とともに摂取させた。8週間後に肝臓を採取し、RNAを抽出して定量RT-PCR法により遺伝子発現を解析した。各遺伝子のmRNA発現量は、GAPDHの発現量で補正後、C群のWTの発現量を1とした時の相対値で表した。Error bar: SD, \*: C群のWTに対する有意差 (\* $p < 0.05$ ), #: 4-PAP群のWTに対する有意差 (# $p < 0.05$ ), 統計処理: 2次元ANOVA-Bonferroni多重比較。

以上の結果から、レスベラトロールによる直接的なPPAR $\alpha$ 活性化において、4'位水酸基の重要性が*in vitro*および*in vivo*の両方で明らかとなった<sup>7)</sup>。

## 2. レスベラトロールによるPDE阻害はPPAR $\alpha$ 活性化を増強する

レスベラトロール、T4HS、4-PAPのPPAR $\alpha$ 活性化を比較したところ、低濃度域では3つの化合物は同様の活性化を示した。濃度を上げていくと、レスベラトロールは2つの化合物より高いPPAR $\alpha$ 活性化を示した。この活性化の違いには、4'位以外の水酸基の関与が考えられた(図3)。このレスベラトロールの活性化のパターンに、新たな分子標的として報告されたPDE阻害<sup>6)</sup>が関係しているのではないかと考え、細胞内cAMPとPPAR $\alpha$ 活性化との関連を検討した。PPREを有するレポーターベクターとヒトPPAR $\alpha$ 発現ベクターを共導入したBAECに、アデニル酸シクラーゼ活性化剤フォルスコリンまたはPDE阻害剤ロリプラムをレスベラトロールと同時に添加し、PPAR $\alpha$ 活性化能を評価した。フォルスコリン(25 $\mu$ M)またはロリプラム(25 $\mu$ M)を単独で添加した場合、すなわち細胞内cAMPが増加した条件だけでは、PPAR $\alpha$ 活性化は検出されなかった。この条件で低濃度レスベラトロール(5 $\mu$ M)を同時に添加すると、レスベラトロールによるPPAR $\alpha$ 活性化が増強された(図3)。

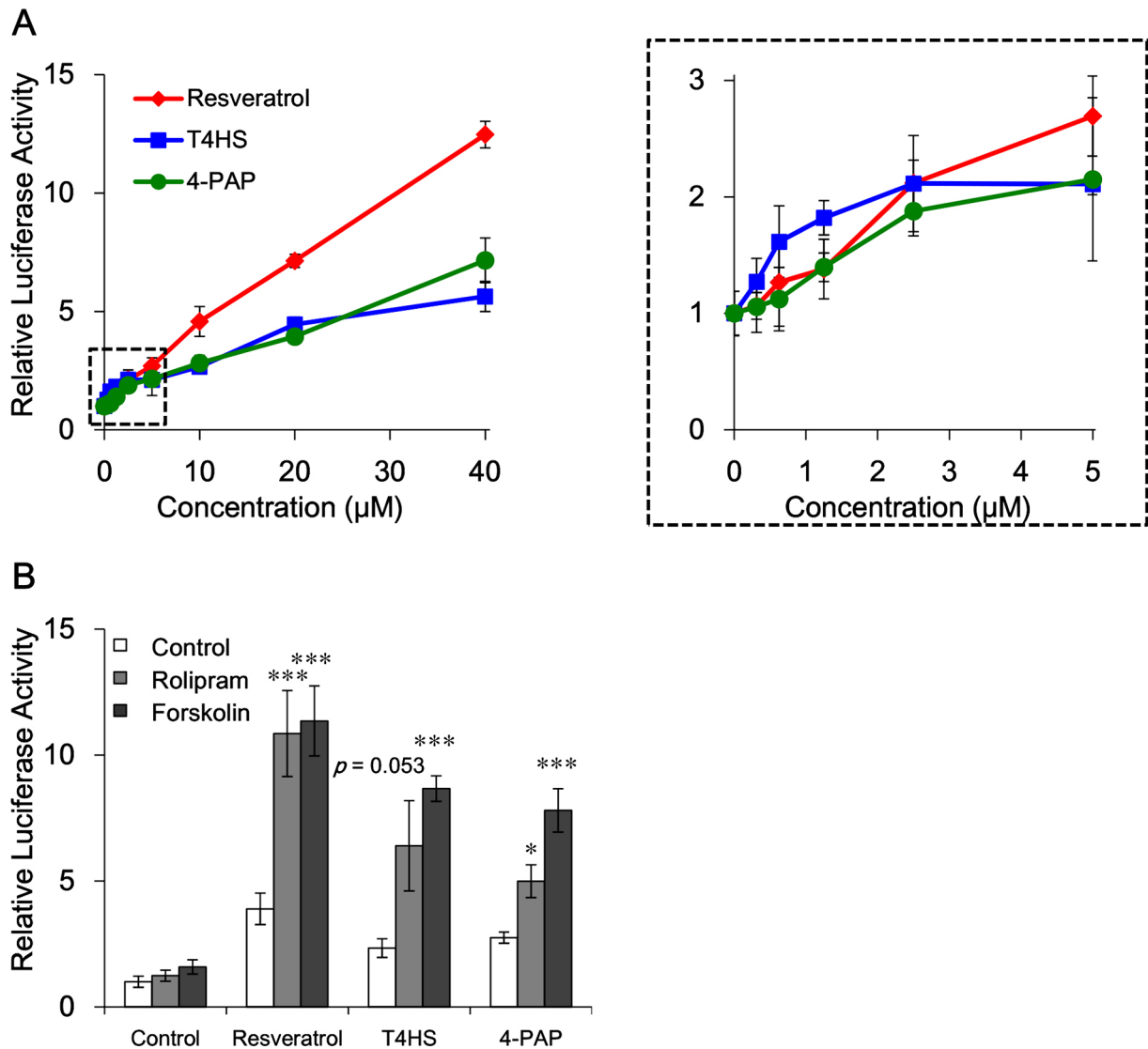


図3. PDE 活性阻害はレスベラトロールによる PPAR $\alpha$  活性化を増強する。

A) レスベラトロール, T4HS および 4-PAP による濃度依存的 PPAR $\alpha$  活性化を検討した. ウシ血管内皮細胞 (BAEC) に PPRE を有するレポーターベクター (PPRE-luc) とヒト PPAR $\alpha$  発現ベクター (GS-hPPAR $\alpha$ ) を共導入し, 各化合物 (0~40  $\mu$ M) 添加 24 時間後のルシフェラーゼ活性を測定した. なお,  $\beta$ -ガラクトシダーゼ発現ベクター (pSV- $\beta$ gal) を同時に導入して, その酵素活性で遺伝子導入効率を補正した. 各化合物の PPAR $\alpha$  活性化は, 0  $\mu$ M を 1 とした相対値で示した. 右側のグラフは, 左側のグラフ中の破線で囲んだ低濃度領域 (0~5  $\mu$ M) に相当する. Error bar: SD. B) レスベラトロール, T4HS および 4-PAP による PPAR $\alpha$  活性化の cAMP 依存的な増強を検討した. BAEC に PPRE-luc と GS-hPPAR $\alpha$  を共導入し, PDE 阻害剤ロリプラムまたはアデニル酸シクラーゼ活性化剤フォルスコリン存在下または非存在下で, 各化合物 (5  $\mu$ M) を添加した. 24 時間後にルシフェラーゼ活性を測定した. なお,  $\beta$ -ガラクトシダーゼ発現ベクター (pSV- $\beta$ gal) を同時に導入して, その酵素活性で遺伝子導入効率を補正した. PPAR $\alpha$  活性化は, ロリプラムおよびフォルスコリン非存在下のコントロール (化合物 0  $\mu$ M) の活性を 1 とした相対値で示した. Error bar: SD. \*: 同一化合物で処置したコントロール (ロリプラムおよびフォルスコリン非存在) に対する有意差 (\* $p$  < 0.01, \*\*\* $p$  < 0.001), 統計処理:  $t$ -test.

以上の結果から, 我々は以下のような機構を考えている (図 4). PPAR $\alpha$  活性化によって脂質代謝が改善されると, 細胞内 ATP 増加/cAMP 減少が生じ, PPAR $\alpha$  活性化がフィードバック制御されるが, レスベラトロールは PDE 活性を阻害して cAMP 減少を抑制することで, PPAR $\alpha$  を持続的に活性化すると考えられた<sup>7)</sup>. このような PPAR $\alpha$  活性

化の cAMP を介したフィードフォワード制御が、食品機能成分であるレスベラトロールの継続的な摂取による生活習慣病予防効果を説明できる作用機構仮説と考え研究を続けている。

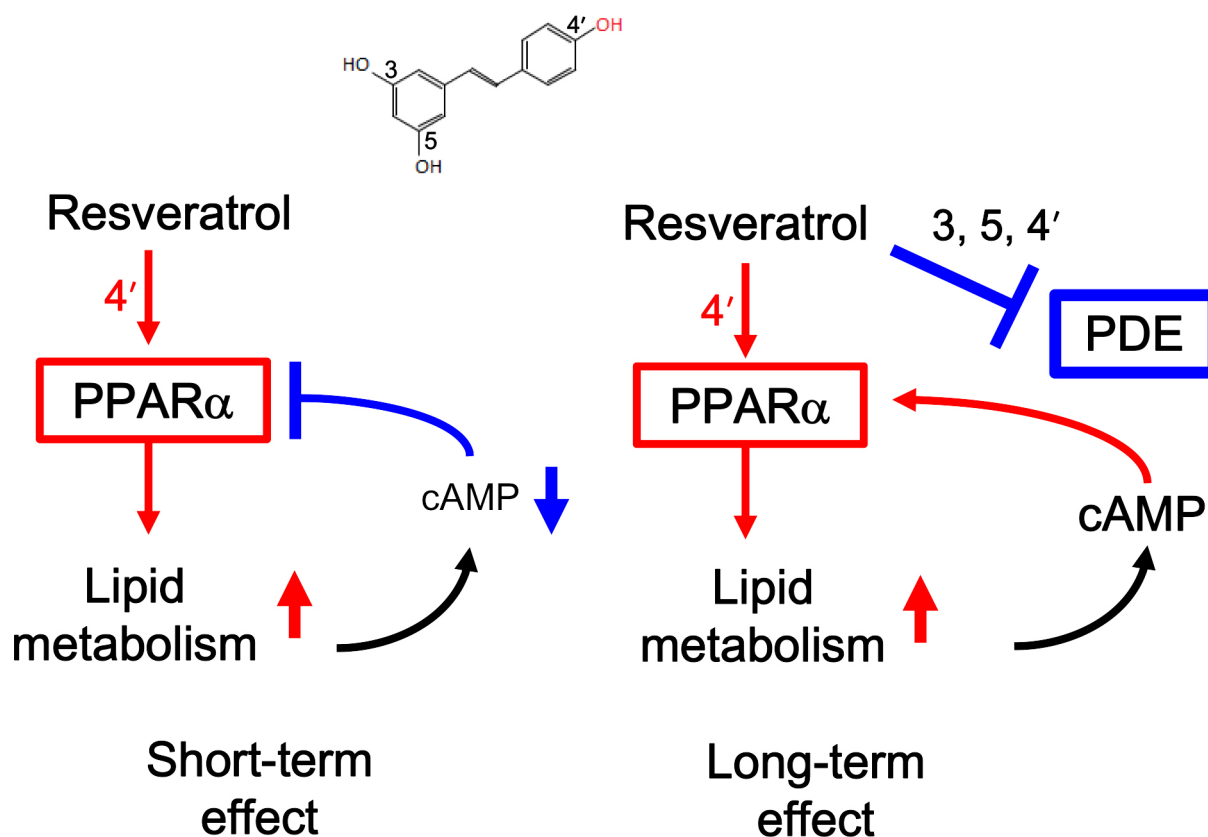


図4. レスベラトロール PPAR $\alpha$  活性化の分子機構 (仮説)。

レスベラトロールによる PPAR $\alpha$  活性化は、cAMP を介するフィードフォワード制御が関与している可能性が考えられた。

### 共同研究者

本研究の共同研究者は、奈良女子大学大学院生活環境科学系の中田理恵子および滝澤祥恵である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

### 文献

- 1) Inoue, H., Jiang, X. F., Katayama, T., Osada, S., Umesono, K. & Namura, S. : Brain protection by resveratrol and fenofibrate against stroke requires peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  in mice. *Neurosci. Lett.*, **352** : 203-206, 2003.
- 2) Tsukamoto, T., Nakata, R., Tamura, E., Kosuge, Y., Kariya, A., Katsukawa, M., Mishima, S., Itoh, T., Iinuma, M., Akao, Y., Nozawa, Y., Arai, Y., Namura, S. & Inoue, H. : Vaticanol C, a resveratrol tetramer, activates PPAR $\alpha$  and PPAR $\beta/\delta$  *in vitro* and *in vivo*. *Nutr. Metab.*, **7** : 46, 2010.
- 3) Hotta, M., Nakata, R., Katsukawa, M., Hori, K., Takahashi, S. & Inoue, H. : Carvacrol, a component of thyme oil, activates PPAR $\alpha$  and  $\gamma$ , and suppresses COX-2 expression. *J. Lipid Res.*, **51** : 132-139, 2010.
- 4) Katsukawa, M., Nakata, R., Takizawa, Y., Hori, K., Takahashi, S. & Inoue, H. : Citral, a component of lemongrass oil, activates PPAR $\alpha$  and  $\gamma$ , and suppresses COX-2 expression. *Bochim. Biophys. Acta*, **1801** : 1214-1220, 2010.
- 5) Katsukawa, M., Nakata, R., Koeji, S., Hori, K., Takahashi, S. & Inoue, H. : Citronellol, and geraniol, components of rose oil, activate PPAR $\alpha$  and  $\gamma$  and suppress COX-2 expression. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **75** : 1010-1012, 2011.

- 6) Park, S. J. : Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases. *Cell*, **148** : 421-433, 2012.
- 7) Takizawa, Y., Nakata, R., Fukuhara, K., Yamashita, H., Kubodera, H. & Inoue H. : The 4'-hydroxyl group of resveratrol is functionally important for direct activation of PPAR  $\alpha$ . *PLoS ONE*, **10** : e0120865, 2015.